



TITLE:

植物組織からのDNA単離

AUTHOR(S):

CITATION:

植物組織からのDNA単離. 全学共通科目 自然科学科目群／生物学 生物学実習Ⅰ [基礎コース] テキスト 2017, 2016: 1-4

ISSUE DATE:

2017-03-15

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/218866>

RIGHT:

植物組織からの DNA 単離

目的

- ①. 生物組織から核酸を抽出する方法とその原理を学習する。
- ②. マイクロピペット（ギルソン社のピペットマンなど）の使い方、そのほかの基本的な実験器具の使い方を習得する。

実験を行うに当たっての注意

1. 実験前と後には手を洗う。
2. 試薬やチューブの中に夾雑物を入れないように注意する。
チューブやチップは滅菌してある。素手で触らないように気をつける。
実験中の「おしゃべり」や「咳」「くしゃみ」は唾液を試薬に混入させ、試薬瓶やピペットマンに付着させるので気をつける。

実験の一連の過程

1. 植物組織を微粉末にする。
2. CTAB によって DNA を溶出する。
2. 溶液からタンパクなどを取り除く。
3. アルコールを加えて DNA を沈殿させる。DNA ペレットの視認。
4. TE に溶解させる。

材料：ブロッコリーの花序

実験台に予め用意されているもの（各自）：

- ・ マイクロピペット 2 種類： P1000（青）（100~1000 μ l 用）
P200（黄）（10~200 μ l 用）
- ・ 3 本のチューブ： キャップに黄色シールで「C」：CTAB が 560 μ l 入っています。
キャップに赤シールで「ク」：クロ-イソ* が 1200 μ l 入っています。
キャップに「TE」：TE が 150 μ l 入っています。
イソプロパノールとエタノールは、別途渡します。
- ・ チューブ立て： 「C」「ク」「TE」、空のチューブ 2 本

葉からの DNA 抽出の手順

1. 教員がやります：ブロッコリーの花序を液体窒素で粉砕する。
2. CTAB のチューブを用意：小葉さじで山盛り **3 杯** を CTAB のチューブに入れる。
3. よく混ぜる（“ボルテックス”にかける）。チューブに自分の印を付ける。
4. 60℃で、20 分間保温する。途中で一回、手でチューブを上下反転して混和する。
5. 除タンパク **注意！** 2 回繰り返す。
 - 1) クロ-イソのチューブを用意、P1000 ピペットマンに青チップを付けて用意：
クロ-イソ液 500 μ l を計りとって加える。（1 回目）。青チップは捨てる。
**注意！ クロロフォルムはプラスチックを溶かすので、ピペットマンの白色部
ならびにサンプル立てに液をこぼさないように気を付ける。**
 - 2) ボルテックスで混和する。
 - 3) 15,000 rpm, 室温, 10min で遠心する。
 - 4) 上清を回収して新しいチューブに移す。
 - 5) P1000 ピペットマンに青チップを付けて用意：クロ-イソ液 500 μ l を加える。
（2 回目）
 - 6) よく混ぜる（“ボルテックス”にかける）。
 - 7) 15,000 rpm, 室温, 10min で遠心する。
 - 8) P1000 ピペットマンに青チップを付ける：上清を回収して新しいチューブに移す。
*** 上清は葉の破砕片を吸い上げないように注意しながらピペットマンで除去する。**
8. DNA の回収
 - 1) -20℃に冷したイソプロパノール 400 μ l を加える。
 - 2) 10,000rpm, 0℃で 10min 遠心する。
遠心の際には、チューブの蝶番部分を外側にしてセットする。
 - 3) チューブを逆さにして液を捨てる。大体でよい。
 - 4) P1000 ピペットマンに青チップを付けて用意：-20℃の 70%エタノール 500 μ l
を加えてリンスする。
 - 5) 10,000rpm, 0℃, 5min 遠心する。遠心の際には、チューブの蝶番部分を
外側にしてセットする。
 - 6) P200 ピペットマンに黄色チップを付けて用意：今度は、ピペットで蝶番の反対
側から液をきれいに全て吸い取る。
 - 7) チューブの蓋を開けて、20 分間減圧乾燥する。（研究の現場では、デシゲータ
で 30 分間減圧乾燥する
9. TE を 100 μ l 加えて DNA を溶解する
もしもペレットが見えない場合には 50 μ l の TE を加える。

解説

通常、植物の DNA は葉から抽出します（花や種子からも抽出は出来ます）。この実習では、植物組織の微粉末から、CTAB という界面活性剤を主にした DNA 抽出液で DNA を抽出します。DNA は高い塩濃度下で界面活性剤があると溶液中に溶出する性質があります。この溶出した液の中にはまだ余分なものが混ざっています。それはタンパク質です。これを除去するために、クロロホルム・イソアミルアルコール混合液で 2 回、液を洗います。

これでもまだ余計なものが混ざっています。それは抽出の過程で液に混ぜた塩や界面活性剤などです。そこで、DNA が 70% アルコール（イソプロパノールやエチルアルコール（以下ではエタノールと呼ぶ））の中で沈殿する特性を利用します（塩などは溶けたままである）。ここでようやく DNA を回収できるわけです。DNA は TE という、DNA を安定した状態で保てる液に溶解して保存します。

試薬

- ・*2 DNA 抽出液（界面活性剤（CTAB）+メルカプトエタノール）

1 サンプルから抽出するのに 560 μ l を使用します。この内容は次のとおりです。

CTAB 555 μ l

メルカプトエタノール 5 μ l

- ・クロ-イソ*：クロロホルム-イソアミルアルコール混合液

（クロロホルム：イソアミルアルコール＝2 5：1 に混合）

- ・イソプロパノール（2-プロパノール）（-20℃に冷やしたもの）

- ・70%エタノール（-20℃に冷やしたもの）

- ・TE =DNA を溶解して保存する水溶液

(10 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 1mM EDTA・2Na)

pH を安定させる役割

DNA 分解酵素の活性を阻害する役割

- ・滅菌水（MiliQ（超純水）をオートクレーブで滅菌する）

付録 実験で使った主な試薬類の組成と調製法について

2 × CTAB 抽出液 (500 ml)

1. 事前に耐熱性メジュームビンに 500 ml の標線をつける。以下の試薬類をいれる。

CTAB (Hexadecyltrimethylammonium Bromide) 10 g

NaCl 41 g

1M Tris-HCl (pH 8.0) 50 ml

EDTA-2Na 3.7 g

2. DW を入れて 500 ml に合わせる（試薬は溶けなくてよい）
3. オートクレーブする（120 °C、20 分間；試薬類は溶ける）。

TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 1mM EDTA • 2Na)

1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 10ml

0.5M EDTA • 2Na (pH 8.0) 2ml

DW

988 ml

10ml に小分けしてオートクレーブにかける

レポートに記載する必須項目

1. CTAB で DNA が抽出できる理由について、DNA の構造と関連させながら解説しなさい。
2. DNA は細胞の核の中で、どのような形で保存されているか、解説しなさい。
3. 70%アルコールのなかで、DNA が沈殿する理由について解説しなさい。

以上